

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 36 491.8

Anmeldetag: 25. Juli 2000

Anmelder/Inhaber: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung: Expression von Alkalischer Phosphatase in Hefe

IPC: C 12 N 15/53

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Ebert

Expression von Alkalischer Phosphatase in Hefe

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zu rekombinanten Herstellung bzw. Expression von eukaryontischer Alkalischer Phosphatase. Die Erfindung betrifft darüber hinaus eine codon-optimierte DNA, kodierend für eine eukaryontische hochaktive Alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Insertion der DNA in einen Vektor zur Expression in Hefe-Zellen.



Alkalische Phosphatasen (AP) sind dimere, zinkhaltige, nichtspezifische Phosphomonoesterasen, die sowohl in prokaryontischen wie auch eukaryontischen Organismen, z.B. in *E. coli* und Säugern vorkommen (McComb et al., 1979 *Alkaline Phosphatases Plenum Press, New York*). Der Vergleich der Primärstruktur verschiedener Alkalischer Phosphatasen ergab einen hohen Homologiegrad (25-30% Homologie zwischen *E. coli*- und Säuger-AP; Millán, 1988 *Anticancer Res.* 8, 995-1004; Harris, 1989 *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150).

Im Menschen und höheren Tieren besteht die AP-Familie aus vier Mitgliedern, die in verschiedenen Genloci codiert sind (Millán, 1988 *Anticancer Res.* 8, 995-1004; Harris 1989 *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150). Zur Familie der Alkalischen Phosphatasen zählen die gewebespezifischen APs (Placenta-AP (PLAP), Germzellen-AP (GCAP) und Darm-AP (IAP)) und die nicht-gewebespezifischen APs (TnAP), die vorwiegend in Leber, Niere und Knochen lokalisiert sind.

Eine entscheidende Eigenschaft der bislang bekannten APs ist die große Variabilität in der katalytischen Aktivität der Säuger-APs, die einen 10-100fach höheren k_{cat} -Wert besitzen als *E. coli*-AP. Unter den Säuger-APs zeigen die APs aus dem Rinderdarm (bIAP) die höchsten spezifischen Aktivitäten. Diese Eigenschaft machen die bIAPs attraktiv für biochemische Anwendungen wie z.B. der Einsatz entsprechender Enzymkonjugate als diagnostisches Reagenz oder zur Dephosphorylierung von DNA. Die Existenz verschiedener Alkalischer Phosphatasen aus dem Rinderdarm mit unterschiedlichen hohen spezifischen Aktivitäten ist in EP 0 955 369 bzw. Manes et al. (1998), *J. Biol. Chem.* 273 No. 36, 23353-23360, beschrieben. Bislang ist eine rekombinante Expression von eukaryontischen niederaktiven (bis 3000 U/mg) Alkalischen Phosphatasen in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien wie z.B. CHO-Zellen (bIAP I/WO 93/18139; Weissig et al.

1993, *Biochem J.* 260, 503-508), COS-Zellen (humane Placenta-AP/Berger et al., 1987 *Biochemistry* 84, 4885-4889) oder Baculovirus-Expressionssystem (humane Placenta-AP/Davis et al. 1992, *Biotechnology* 10, 1148-1150) beschrieben. Auch ist die Expression von höher aktiven AP's (spez. Aktivität >3000 U/mg) aus dem Rinderdarm in CHO-Zellen beschrieben (bIAP II, III und IV/Manes et al. 1998, *J. Biol. Chem.* 273 No. 36, 23353-23360). Nachteil der Expression von Alkalischen Phosphatasen in diesen Expressionssystemen ist jedoch die geringe Expressionsleistung, die die rekombinante Herstellung, insbesondere einer hochaktiven AP nicht wirtschaftlich macht.

Eine Expression von eukaryontischen Alkalischen Phosphatasen in prokaryontischen Expressionssystemen wie z.B. *E. coli* ist zwar prinzipiell möglich (humane Placenta-AP/Beck and Burtcher, 1994 *Protein Expression and Purification* 5, 192-197), jedoch weisen die in Prokaryonten exprimierten Alkalischen Phosphatasen keine Glykosylierung auf, die insbesondere bei der Herstellung von Enzymkonjugaten essentiell ist.

Demzufolge liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein widerstandsfähiges und stabiles Expressionsverfahren zur Herstellung glykosylierter eukaryontischer Alkalischer Phosphatase mit hoher spezifischer Aktivität zu entwickeln, das zudem auf Grund hoher Expressionsleistung eine wirtschaftliche Herstellung einer entsprechenden Alkalischen Phosphatase ermöglicht und darüber hinaus ein Enzym liefert, das bezüglich seiner Eigenschaften wie z.B. spezifischer Aktivität und Thermostabilität mit der nativen hochaktiven oder niederaktiven Alkalischen Phosphatase (kommerziell erhältlich z.B. bei Roche Diagnostics GmbH, Biozyme, Oriental Yeast) vergleichbar ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer eukaryontischen Alkalischen Phosphatase mit hoher spezifischer Aktivität in Hefe, insbesondere in einer methylotrophen Hefe umfassend die Schritte:

- a) Klonierung einer Gensequenz in unterschiedlichen Vektoren
- b) Transformation der Hefe,
- c) Expression und
- d) Reinigung der Alkalischen Phosphatase,
dadurch gekennzeichnet, daß
 - (i) ein erster Vektor ein Resistenzgen gegen einen ersten Selektionsmarker aufweist,

- (ii) Transformanten, die das Resistenzgen und die Gensequenz in das Genom integriert haben, durch Wachstum auf Nährmedium mit einer geringen Konzentration an erstem Selektionsmarker selektioniert werden,
- (iii) die Genkopienzahl durch Mehrfachtransformation erhöht wird, wobei Mehrfachtransformanten durch Wachstum auf Nährmedium mit erhöhtem Selektionsdruck selektioniert werden,
- (iv) ein zweiter Vektor, welcher neben der Gensequenz ein Resistenzgen gegen einen zweiten Selektionsmarker aufweist, zugegeben wird,
- (v) die Genkopienzahl durch Mehrfachtransformation mit dem zweiten Vektor erhöht wird, wobei Mehrfachtransformanten durch Wachstum auf Nährmedium mit erhöhtem Selektionsdruck selektioniert werden, und
- (vi) die Klone selektioniert werden, die mehrere Kopien der Gensequenz und der Selektionsmarker-Resistenzgene stabil in das Genom integriert haben.

Bevorzugt ist als Gensequenz eine DNA-Sequenz, die für eine eukaryontische alkalische Phosphatase codiert, welche eine spezifische Aktivität von mehr als 3000 U/mg, in besonderen Fällen von über 7000 U/mg bis etwa 10.000 U/mg aufweist. Beispielsweise hat sich erfindungsgemäß eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 als geeignet erwiesen. Besonders bevorzugt wird eine codon-optimierte DNA-Sequenz, die auf Aminosäure-Ebene der Gensequenz SEQ ID NO: 1 entspricht. Codon-Optimierung bedeutet, daß durch stumme Mutation, d.h. Änderungen auf DNA-Ebene, die sich jedoch nicht auf Aminosäure-Ebene auswirken, jedes Codon beispielsweise von SEQ ID NO: 1 zur Steigerung der Translation nach den Bedürfnissen des ausgewählten Expressionwirtes optimiert wird, wodurch beispielsweise die Gensequenz gemäß SEQ ID NO: 5 erhalten wird. Es können jedoch auch andere Gensequenzen als SEQ ID NO: 1, die für Alkalische Phosphatasen codieren und gegebenenfalls codon-optimiert sind, in den Vektor eingebaut werden, wie z.B. bIAP1, III, IV (DE 198 19 962 bzw. EP 0 955 369). Besonders bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Verwendung einer codon-optimierten Gensequenz gemäß SEQ ID NO: 5. Die entsprechende Gensequenz wird dann in einen oder mehrere Vektor(en) kloniert, welche(r) entsprechend dem zu transformierenden Wirt ausgewählt wird bzw. werden.

Als Hefe-Wirt sind besonders methylotrophe Hefen, z.B. Hefe *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* oder *Schizosaccharomyces pombe* geeignet. Geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, wie beispielsweise pPICZ α A, pPIC9K, Yes-Vektoren, pTEF1/Zeo, pYDI (z.B. Invitrogen). Der so entstandene Expressionsvektor wird bevorzugt in verschiedene Stämme von *Pichia pastoris* transformiert und stabil in das Genom

integriert werden. Die stabile Integration in das Hefegenom hat den Vorteil, daß bei der späteren Produktion der beispielsweise eukaryontischen, hochaktiven Alkalischen Phosphatase in großvolumigen Fermenten kein Selektionsdruck benötigt wird. Stabile Integration in das Genom bedeutet, daß der Expressionsvektor über homologe Rekombination in das Genom von z.B. *Pichia pastoris* eingebaut wird und somit als fester Bestandteil des Hefegenoms von Generation zu Generation weitervererbt wird (Cregg, J.M. et al., *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985), 3376-3385).

Die Erhöhung der Genkopienzahl in der methylotrophen Hefe wurde durch Mehrfachtransformation bei gleichzeitiger Erhöhung des Selektionsdruckes mit einem geeigneten Selektionsmarker, z.B. einem Antibiotikum wie beispielsweise Zeocin® bzw. Geneticin (G418) oder einem Auxotrophiemarker erreicht, wonach nur Klone lebensfähig sind, die mehrere Kopien des Expressionsvektors stabil in das Genom integriert haben. Um gegen höhere Konzentrationen des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums resistent zu sein, ist es erforderlich, daß die Klone vermehrt Resistenzprotein produzieren. Dies kann beispielsweise durch eine multiple Integration des Expressionsvektors erfolgen, der neben der Expressionskassette für die beispielsweise hochaktive Alkalische Phosphatase auch das Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete Antibiotikum enthält.

Die Aufgabe eukaryontische Alkalische Phosphatase in einem widerstandsfähigen und stabilen Expressionsverfahren mit hoher Expressionsleistung wirtschaftlich herzustellen, konnte erst durch die Kombination der Maßnahmen (i) bis (vi) erreicht werden. So führte beispielsweise die Transformation eines *Pichia pastoris* Stammes X-33 mit einem Expressionsvektor, der das bIAP-II-Gen gemäß SEQ ID NO: 1 enthält, ohne diese Maßnahmen nicht zum gewünschten Erfolg (siehe Beispiel 1 und 2). Mit dem Verfahren konnte zwar die Expressionsleistung im Vergleich zu der Expression von bIAP-II in CHO-Zellen (Manes et al., 1998 *J. Biol. Chem.* 273 No. 36, 23353-23360) erheblich gesteigert werden, jedoch erlaubt das Verfahren nicht die Herstellung einer rekombinanten Alkalischen Phosphatase unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten.

Eine der erforderlichen Maßnahmen zur Bereitstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Synthese einer codon-optimierten Gensequenz. Um jedes Codon zur Expression in Hefe zu optimieren war eine komplette de novo Synthese des ca. 1,5 kBp langen Gens, das für die eukaryontische hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert, erforderlich. Durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der eukaryontischen hochaktiven Alkalischen Phosphatase gemäß SEQ ID No. 4 (bIAP-II) konnte durch Ausnutzung des degenerierten Codes jedes Codon, wenn erforderlich, optimiert werden. Dazu wurde das Gen in 28 Oligonukleotide mit einer Länge von 54 bis 82

Nukleotide unterteilt. Die Oligonukleotide wurden als alternierende Folge von Sinnstrang- und Gegenstrangfragment entworfen, die jeweils mit ihren 5'- bzw. 3'-Enden mit den benachbarten Oligonukleotiden komplementär überlappten. Der Überlappungsbereich wurde jeweils so gewählt, daß bei der Annealingreaktion in der späteren PCR-Reaktion eine unspezifische Bindung weitgehend verhindert wird. Die Oligonukleotide am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens wurden stromaufwärts bzw. stromabwärts des kodierenden Bereichs mit Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen versehen, die für eine spätere Insertion des synthetischen Gens gemäß SEQ ID No. 5 in Expressionsvektoren genutzt werden konnten. So wurde stromaufwärts eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI und stromabwärts eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease Asp718 eingebaut. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in SEQ ID No. 6 bis 33 dargestellt.

Die Gensynthese wurde mittels PCR-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde der kodierende Bereich zunächst in drei Teilstücke unterteilt (Oligonukleotide 6 bis 15, 16 bis 23, 24 bis 33) und diese Teilstücke in getrennten PCR-Reaktionen erzeugt. Bei der Gensynthese mit überlappenden komplementären Oligonukleotiden mittels PCR-Reaktion erfolgt dabei ein schrittweises Verlängern des Genfragmentes bis zum volle Länge-Produkt, das dann in den weiteren Zyklen amplifiziert wird. Die Annealingtemperatur richtet sich dabei nach dem Überlappungsbereich mit der geringsten Schmelztemperatur.

Die drei Teilstücke wurden anschließend mittel Agarosegelelektrophorese analysiert, die Produkte mit der erwarteten Länge aus dem Gel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert und in einer weiteren PCR-Reaktion zu dem kompletten Genprodukt synthetisiert. Die PCR-Reaktion wurde dabei in den ersten 5 Zyklen ohne Zugabe der Primern am 5'-Ende und am 3'-Ende des gesamten Gens durchgeführt, so daß zunächst aus den drei Teilstücken wenige Fragmente des Genproduktes der erwarteten Länge entstehen. Die Annealingtemperatur richtet sich dabei nach dem Überlappungsbereich mit der geringsten Schmelztemperatur. Danach wurden die endständigen Primer zugegeben und die Annealingtemperatur entsprechend der Annealingtemperatur des Primers mit der geringsten Schmelztemperatur erhöht. In weiteren 25 Zyklen wurde danach das Genfragment der erwarteten Länge hochamplifiziert.

Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, das Genfragment mit der erwarteten Größe isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen).

Die Klonierung eines entsprechenden PCR Fragmentes, die Transformation in *Pichia pastoris* sowie die Expression ist in Beispiel 3 beschrieben.

Mit dem Codon-optimierten Gen für die hochaktive Alkalische Phosphatase konnte die Expressionsleistung um den Faktor 3 gegenüber den ersten Versuchen mit dem Wildtypgen gesteigert werden.

Jedoch war mit diesen Klonen noch kein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung der hochaktiven Alkalischen Phosphatase erreicht.

Eine Maßnahme zur Steigerung der Expressionsleistung heterologer und homologer Proteine in *Pichia pastoris* ist die Erhöhung der Genkopienzahl in der Zelle durch Mehrfachtransformation. Diese Maßnahme kann die Erhöhung des Transkriptionsproduktes, der mRNA des Zielgens, dienen. Man erreicht die Erhöhung der Genkopienzahl durch Mehrfachtransformation eines Klones mit dem Expressionsvektor bei gleichzeitiger Erhöhung des Selektionsdruckes beim anschließenden Wachstum der Transformanten auf Nährplatten mit erhöhter Konzentration des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums. Dabei wird ein Expressionsklon, der aus dem ersten Transformationsdurchgang bereits mindestens eine Kopie des Expressionsvektors aufgenommen haben, wieder kompetent gemacht (s. Beispiel 1) und wieder mit Expressionsvektor transformiert. Selektioniert werden Transformanten, die mehrere Kopien des Expressionsvektors in das Genom integriert haben, durch Ausplattieren auf Nährplatten mit höherem Selektionsdruck, d.h. Platten mit einer höheren Konzentration des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums (z.B. Zeocin®), als beim ersten Transformationsdurchgang. Dabei wird zunächst die höchste Konzentration des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums, bei der die Klone aus dem ersten Transformationsdurchgang noch wachsen können, ermittelt und demzufolge die Konzentration des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums in den YPDS-Agarplatten nach der zusätzlichen Transformation über den ermittelten Schwellenwert erhöht. Durch die Erhöhung der Kopienzahl des Expressionsvektors wird auch die Kopienzahl des Resistenzgens, das Bestandteil des Expressionsvektors ist, erhöht und damit auch die Resistenz gegen höhere Konzentrationen des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums erreicht. Durch Variation der Konzentration des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums in den Nährplatten (ca. 100 bis 2000 µg/ml) können auch Klone mit unterschiedlich hohen Kopienzahlen des Expressionsvektors im Genom selektioniert werden (s. Beispiel 4).

Eine weitere Maßnahme zur Steigerung der Expressionsleistung heterologer und homologer Proteine in Hefe, wie beispielsweise *Pichia pastoris* ist die Erhöhung der Genkopienzahl durch Mehrfachselektion. Man erreicht dies durch Transformation eines Expressionsklons, der bereits durch Mehrfachtransformation mit einem Expressionsvektor, der die Expressionskassette mit dem Zielgen (z.B. das Gen, das für die hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert gemäß SEQ ID NO: 5) und ein Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete erste Antibiotikum (z.B. Zeocin®) enthält, optimiert wurde, mit einem zweiten Expressionsvektor, der das Zielgen (z.B. das Gen, das für die hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert gemäß SEQ ID NO: 5) und ein Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete zweite Antibiotikum (z.B. Geneticin (G418)) enthält. Beim anschließenden Ausplattieren der Transformanten auf Nährplatten, die das zweite Antibiotikum als Selektionsmarker enthalten, werden nur Klone selektioniert, die neben den Kopien des Expressionsvektors mit Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete erste Antibiotikum auch mindestens eine Kopie des Expressionsvektors mit Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete zweite Antibiotikum aufgenommen haben. Diese Expressionsklone können nun wiederum einer weiteren Mehrfachtransformation mit dem Expressionsvektor mit Resistenzgen für das als Selektionsmarker verwendete zweite Antibiotikum unterzogen werden (s. Beispiel 5).

Durch die Kombination der Maßnahmen der Mehrfachtransformation und der Doppelselektion konnte die Expressionsleistung um den Faktor 4 gegenüber der Expressionsleistung der Klonen aus dem ersten Transformantendurchgang mit den codon-optimierten Gen gesteigert werden.

Die rekombinante Alkalische Phosphatase kann durch Extraktionsmethoden, die dem Fachmann prinzipiell bekannt sind, aus der Biomasse extrahiert werden z.B. "Protein Purification", Springer-Verlag, Herausg. Robert Scopes (1982). Durch chromatographische Trennungsmethoden, wie insbesondere unter Verwendung von hydrophoben Säulenmaterialien und eines Kationenaustauschers, wird ein bandenreines Produkt mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 7000 U/mg erzielt.

Um die rekombinante hochaktive Alkalische Phosphatase zu charakterisieren wurde das gereinigte Produkt einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen.

Es wurde dominant die Sequenz EAEAEFLIPA (SEQ ID NO: 36) bestimmt. Die Sequenz korreliert eindeutig mit der N-terminalen Sequenz der AP "LIPA" (SEQ ID NO: 37) und dem Linkerpeptid des Konstruktes EAEAEF (SEQ ID NO: 38), das durch die Klonierungsstrategie der

Genesequenz in den Vektor und durch die Abspaltung des α -Faktor-Signalpeptides durch eine Kex2-Signalpeptidase (z.B. Invitrogen) entsteht.

Die Stabilität der rekombinanten Alkalischen Phosphatase Produktes wurde im Vergleich zu der natürlich vorkommenden Alkalischen Phosphatase untersucht. Die Proben ergeben bei einer thermischen Belastung (55°C) der Lösung vergleichbare Ergebnisse.

Mit der vorliegenden Erfindung wird somit erstmals ein Verfahren beschrieben, daß eine wirtschaftliche Herstellung einer rekombinanten Alkalischen Phosphatase aus Säugerzellen, wie z.B. Rinderdarm ermöglicht, die vergleichbare Eigenschaften zur nativen hochaktiven Alkalischen Phosphatase aus dem Rinderdarm besitzt und glykosyliert ist.

Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine DNA Sequenz gemäß SEQ ID NO: 5 als codon-optimierte Genesequenz für die Expression des Gens der hochaktiven Alkalischen Phosphatase *Pichia pastoris*.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Vektor enthaltend SEQ ID NO: 5, besonders bevorzugt ist ein Vektor pHAP10-3 gemäß Fig. 2. pHAP10-3 ist der Vektor pPICZ α A, der kommerziell erhältlich ist (Invitrogen), und der das erfindungsgemäße Gen gemäß SEQ ID NO: 5 enthält, das unter Kontrolle des AOX 1-Promotors steht.

Des weiteren ist Gegenstand der Erfindung ein Wirtstamm, der mit den erfindungsgemäßen Vektoren transformiert wurde. Besonders bevorzugt ist der *Pichia pastoris* X-33 Stamm transformiert mit Vektor pHAP10-3.

Des weiteren bevorzugt ist ein Vektor, der die gesamte Expressionskassette aus pHAP 10-3 enthält, die im wesentlichen aus dem AOX 1-Promotor, dem Signalpeptid des α -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae*, das im korrekten Leserahmen hinter das Signalpeptid kloniert codon-optimierte Zielgen gemäß SEQ ID NO: 5, das für die hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert und der AOX 1-Transkriptionsterminationsregion besteht (siehe Fig. 3). Besonders bevorzugt ist der Vektor pHAP 10-3/9K, der aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pPIC9K (Invitrogen) und der Expressionskassette aus pHAP 10-3, einschließlich des synthetischen Gens gemäß SEQ ID NO: 5 besteht.

Die Vektoren pHAP 10-3 und pHAP 10-3/9K sind gleichermaßen relevant, da der letztendliche Produktionsklon Kopien von beiden Vektoren enthält.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Wirtsstamm, der mit dem pHAP10-3/9K-Vektor transformiert wurde. Geeignet im Sinne der vorliegenden Erfindung sind jedoch auch andere dem Fachmann bekannte Vektoren und Stämme, wie beispielsweise YES-Vektoren, pYD1, pTEF 1/ZEO (Invitrogen) und *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharmyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* und insbesondere *Pichia pastoris* X-33. Insbesondere ist erfindungsgemäß der *Pichia pastoris* X-33 Stamm transformiert mit dem Vektor pHAP10-3/9K bevorzugt.

Demzufolge ist darüber hinaus Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer eukaryontischen hochaktiven Alkalischen Phosphatase durch Expression des Proteins in einem Wirtsstamm, der mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen Vektor(en), insbesondere mit dem pHAP10-3 Vektor bzw. pHAP10-3/9K Vektor transformiert wurde. *Pichia pastoris*-Stämme, die mit erfindungsgemäßen Vektoren transformiert wurden, sind für das erfindungsgemäße Verfahren besonders bevorzugt. Insbesondere bevorzugt ist dabei der Stamm *Pichia pastoris* X-33, der mit einem pHAP 10-3- und einem pHAP 10-3/9K-Vektor transformiert ist.

Abbildungen

Abbildung 1

Plasmidkarte von Expressionsvektor pHAP-1 mit dem bLAPII-Gen in pICZ α A (Invitrogen).

Abbildung 2

Plasmidkarte von Expressionsvektor pHAP10-3 mit dem synthetischen Gen in pPIC9K (Invitrogen).

Abbildung 3

Plasmidkarte von Expressionsvektor pHAP10-3/9K mit dem synthetischen Gen in pPIC9K (Invitrogen).

Abkürzungen

YPD:	Yeast Peptone Dextrose
YPDS:	Yeast Peptone Dextrose Sorbitol
BMGY:	Buffered Glycerol-complex medium
BMMY:	Buffered Methanol-complex medium

Beispiel 1:Klonierung des bIAPII-Gens

Das bIAPII-Gen gemäß SEQ ID No. 1 (EP 0 955 369; Manes et al., 1998, *J. Biol. Chem.* 273 No. 36, 23353-23360) wurde zunächst mittels PCR und Wahl geeigneter Primer gemäß SEQ ID NO: 2 und 3 stromaufwärts und stromabwärts mit für die Klonierung in Expressionsvektoren für *Pichia pastoris* geeigneten Restriktionsendonukleaseschnittstellen versehen. So wurde stromaufwärts die Restriktionsendonukleaseschnittstelle für EcoRI und stromabwärts die Restriktionsendonukleaseschnittstelle Asp718 I angehängt.

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI und Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) nachgeschnitten, nochmals isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) und anschließend in ein mit EcoRI und Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) linearisiertes und isoliertes (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) Vektorfragment des Expressionsvektors pPICZ α A (Invitrogen) ligiert. In diesem Vektor steht das bIAPII-Gen unter Kontrolle des AOX 1-Promotors (Promotor für die Alkoholoxidase 1 aus *Pichia pastoris*, mit Methanol induzierbar und wird im korrekten Leserahmen hinter das Signalpeptid des α -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert. Das so insertierte Genfragment wurde dann mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf fehlerfreie Basensequenz untersucht. Der so entstandene Expressionsvektor, der das bIAPII-Gen enthält, das für die eukaryontische hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert, wurde pHAP-1 (s. Fig. 1) genannt.

Transformation von pHAP-1 in *Pichia pastoris*

Zur Transformation von pHAP-1 in *Pichia pastoris* X-33 mit anschließender Integration in das Genom wurde der Vektor zunächst mit SacI (Roche Diagnostics GmbH) linearisiert. Die Transformation wurde mittels Elektroporation mit dem Gene Pulser II (Biorad) durchgeführt.

Dazu wurde eine Kolonie von *Pichia pastoris* Wildtypstamm in 5 ml YPD-Medium (Invitrogen) angeimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde anschließend 1:2000 in 200 ml frisches YPD-Medium (Invitrogen) überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1,3 – 1,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 x g / 5 Minuten) und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert (1500 x g/5 Minuten) und in 100 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentri-

fugiert, in 0,5 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Eis gehalten und sofort zur Transformation eingesetzt.

80 µl der Zellen wurden mit ca. 1 µg linearisierter pHAP-1-Vektor-DNA versetzt und der gesamte Ansatz in eine eiskalte (0°C) Elektroporationsküvette transferiert und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Gene Pulser II (Biorad) überführt und die Transformation bei 1 kV, 1 kΩ und 25µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz mit 1 ml 1M Sorbitol (ICN) versetzt und anschließend 100 bis 150 µl auf eine YPDS-Agarplatte (Invitrogen) mit 100µg/ml Zeocin® (Invitrogen) ausplattiert. Die Platten wurden anschließend 2–4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Klone wurden auf Raster-MD (= minimal Dextrose)-Platten überimpft und weiter analysiert. Gewachsene Klone wurden gepickt, in 20 µl steriles Wasser resuspendiert, mit 17,5 U Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) aufgeschlossen (1 Stunde, 37°C) und direkt mittels PCR auf die korrekte Integration der bIAPII-Expressionskassette untersucht.

Klone, die die komplette Expressionskassette bei der Transformation in das Genom integriert haben, wurden dann in Expressionsversuchen eingesetzt.

Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase

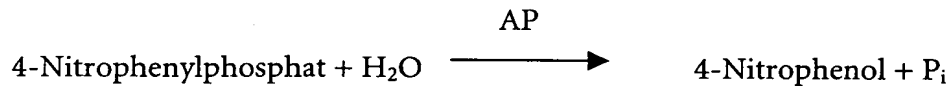
Positive Klone wurden in 3 ml BMGY-Medium (Invitrogen) angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die OD bei 600 nm bestimmt und so in 10ml BMMY-Medium (Invitrogen) überimpft, daß eine OD₆₀₀ von 1 resultierte. Das BMMY-Medium (Invitrogen) enthält Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), das die Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase über den AOX 1-Promotor induziert.

Die Schüttelkolben wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert, alle 24 Stunden Proben gezogen, die OD₆₀₀ bestimmt, ein Aktivitätstest auf Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase durchgeführt und jeweils mit 0,5% Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.) zur weiteren Induktion nachgefüttert. Die Expressionsversuche liefen über 96 Stunden.

Beispiel 2:Test auf Aktivität der hochaktiven Alkalischen Phosphatase

Je 500 µl wurden der Expressionskultur gemäß Beispiel 1 entnommen, die OD₆₀₀ bestimmt und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Zellpellet wurde in einer der OD₆₀₀ entsprechenden Menge Y-PERTM (50 bis 300 µl/Pierce) zur Lyse resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat zur Abtrennung von Zelltrümmern abzentrifugiert (15000 x g/5 Minuten) und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. 5 µl des Lysates wurden dann im Aktivitätstest eingesetzt.

Der Aktivitätstest funktioniert nach folgendem Prinzip:



Gemessen wird die Absorptionzunahme bei 405 nm.

3 ml Diethanolamin-Puffer (1 mol/L Diethanolamin (Merck) pH 9,8, 0,5 mmol/L MgCl₂ (Riedel de Haen)) wurden mit 50 µl 4- Nitrophenylphosphatlösung (0,67 Mol/L 4- Nitrophenylphosphat, Na-Salz (Roche Diagnostics GmbH)) versetzt und der Ansatz auf 37°C temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Lysat gestartet und die Absorptionsänderung bei 37°C über 3 Minuten bestimmt und daraus das ΔE/min berechnet.

Die Aktivität wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{3,10}{\epsilon \times 0,005 \times 1} \times \Delta E/\text{min} \times \frac{1}{\text{Faktor} \times} \quad [\text{U/ml Probelösung}]$$

$$\epsilon = 18,2 [1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

Faktor x = Konzentrierungsfaktor nach Zellaufschluss

Analog wurde die Aktivität aus dem Mediumüberstand der Expressionskulturen bestimmt. Hier wurden ebenfalls die Reaktion mit 5 µl des Überstandes gestartet, jedoch wurden zusätzlich noch jeweils 0,5 mM ZnCl₂ zugegeben. Die Berechnung erfolgte dabei ohne Faktor x.

Beispiel 3:

Klonierung des PCR-Fragmentes aus der Gensynthese

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI und Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) nachgeschnitten, nochmals isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) und anschließend in ein mit EcoRI und Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) linearisiertes und isoliertes (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) Vektorfragment des Expressionsvektors pPICZαA (Invitrogen) ligiert. In diesem Vektor steht das synthetische Gen unter Kontrolle des AOX 1-Promotors (Promotor für die Alkoholoxidase 1 aus *Pichia pastoris*, mit Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.) induzierbar) und wird im korrekten Leserahmen hinter das Signalpeptid des α-Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert. Das so insertierte Genfragment wurde dann mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf fehlerfreie Basensequenz untersucht. Der so entstandene Expressionsvektor, der ein synthetisches Gen, das für die eukaryontische hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert, enthält wurde pHAP10-3 (s. Fig. 2) genannt.

Transformation von pHAP10-3 in *Pichia pastoris*

Zur Transformation von pHAP10-3 in *Pichia pastoris* X-33 mit anschließender Integration in das Genom wurde der Vektor zunächst mit SacI (Roche Diagnostics GmbH) linearisiert. Die Transformation wurde mittels Elektroporation mit dem Gene Pulser II (Biorad) durchgeführt. Dazu wurde eine Kolonie von *Pichia pastoris* 5 ml YPD-Medium (Invitrogen) angeimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde anschließend 1:2000 in 200 ml frisches YPD-Medium (Invitrogen) überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 x g / 5 Minuten) und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert (1500 x g/5 Minuten) und in 100 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 0,5 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Eis gehalten und sofort zur Transformation eingesetzt.

80 µl der Zellen wurden mit ca. 1 µg linearisierter pHAP10-3-Vektor-DNA versetzt und der gesamte Ansatz in eine eiskalte (0°C) Elektroporationskuvette transferiert und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kuvette in den Gene Pulser II (Biorad) überführt und die Transformation bei 1 kV, 1 kΩ und 25µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz mit 1 ml 1M Sorbitol (ICN) versetzt und anschließend 100 bis 150 µl auf eine YPDS-Agarplatte (Invitrogen) mit 100µg/ml Zeocin® (Invitrogen) ausplattiert. Die Platten wurden anschließend 2 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Klone wurden auf Raster-MD (= minimal Dextrose)-Platten überimpft und weiter analysiert. Gewachsene Klone wurden gepickt, in 20 µl steriles Wasser resuspendiert, mit 17,5 U Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) aufgeschlossen (1 Stunde, 37°C) und direkt mittels PCR auf die korrekte Integration der synthetischen AP-Expressionskassette untersucht.

Klone, die die komplette Expressionskassette bei der Transformation in das Genom integriert haben, wurden dann in Expressionsversuchen eingesetzt.

Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase

Positive Klone wurden in 3 ml BMGY-Medium (Invitrogen) angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die OD bei 600 nm bestimmt und so in 10ml BMMY-Medium (Invitrogen) überimpft, daß eine OD₆₀₀ von 1 resultierte. Das BMMY-Medium (Invitrogen) enthält Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), das die Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase über den AOX 1-Promotor induziert.

Die Schüttelkolben wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert, alle 24 Stunden Proben gezogen, die OD₆₀₀ bestimmt, ein Aktivitätstest auf Expression der hochaktiven Alkalischen Phosphatase durchgeführt und jeweils mit 0,5% Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.) zur weiteren Induktion nachgefüttert. Die Expressionsversuche liefen über 96 Stunden.

Test auf Aktivität der hochaktiven Alkalischen Phosphatase

Je 500 µl wurden der Expressionskultur entnommen, die OD₆₀₀ bestimmt und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Zellpellet wurde in einer der OD₆₀₀ entsprechenden Menge Y-PER™ (50 bis 300 µl/Pierce) zur Lyse resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat zur Abtrennung von Zelltrümmern abzentrifugiert (15000 x g/5 Minuten) und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. 5 µl des Lysates wurden dann im Aktivitätstest eingesetzt.

Der Aktivitätstest wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Beispiel 4:

Steigerung der Expressionsleistung durch Mehrfachtransformation

Die besten Klone aus den Expressionsversuchen wurden wiederum für die Elektroporation wie oben beschrieben vorbereitet und wiederum mit 1 µg linearisierter pHAP10-3-Vektor-DNA transformiert und der Transformationsansatz auf YPDS-Agarplatten (Invitrogen) mit 1000 bis 2000 µg/ml Zeocin® (Invitrogen) ausplattiert. Dadurch wird der Selektionsdruck derart erhöht, daß nur Klone wachsen können, die mehrere Kopien des Expressionsvektors pHAP10-3 und somit auch mehrere Kopien jeweiligen Resistenzgens (hier Zeocin®) in das Genom integriert haben. Das Zeocin®-Resistenzprotein ist das Produkt des Bleomycingens von *Streptoalloteichus hindustanus* (Chalmers, T. et al., Curr. Genet. 20 (1991), 309-314; Drocourt, D. et al., Nucleic Acid Research 18 (1990), 4009), das Zeocin® in einem stöchiometrischen Konzentrationsverhältnis bindet und somit der Zelle Resistenz gegenüber Zeocin® verleiht. Je höher die Konzentration an Zeocin® in den YPDS-Agarplatten, um so mehr Resistenzprotein muß die Zelle erzeugen, um das Zeocin® quantitativ zu binden und damit ein Wachstum zu ermöglichen. Dies ist u.a. möglich, wenn multiple Kopien des Resistenzgens in das Genom integriert werden. Klone wurden wie oben beschrieben auf Raster-MD-Platten überimpft und wiederum wie oben beschrieben mittels PCR-Analyse auf korrekte Integration der haAP-Expressionskassette überprüft. Anschließend wurden diese Klone wiederum wie oben beschrieben auf haAP-Aktivität getestet.

Beispiel 5:

Steigerung der Expressionsleistung durch Verwendung eines zweiten Selektionsdruckes

Eine Steigerung der Zeocin®-Konzentration über 2000 µg/ml führte nicht zu einer verbesserten Expressionsleistung der hochaktiven Alkalischen Phosphatase. Um die Genkopienzahl des Gens gemäß SEQ ID NO: 5, das für die hochaktive Alkalische Phosphatase kodiert und für die Expression in Hefe codon-optimiert ist, in den Expressionsklonen weiter zu erhöhen, wurde die Integration zusätzlicher Expressionsvektoren in das Genom der aus Beispiel 3 und 4 hervorgegangenen Expressionsklone mit der höchsten Expressionsleistung über einen zweiten Selektionsdruck, bevorzugt G418 (Roche Diagnostics GmbH) selektioniert. Zu diesem Zweck wurde die gesamte Expressionskassette aus pHAP10-3, bestehend aus AOX 1-Promotor, Signalpeptid des

α -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae*, codon-optimiertes Gen für die hochaktive Alkalische Phosphatase gemäß SEQ ID NO: 5 und AOX 1-Transkriptionsterminations-Region, mittels PCR durch entsprechend gewählte Primer isoliert wie unten beschrieben in den Vektor pPIC9K kloniert, dessen Integration in das Genom von *Pichia pastoris* über G418 (Roche Diagnostics GmbH) selektioniert wird. Die Primer sind in SEQ ID NO: 34 und 35 dargestellt.

Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, das Genfragment mit der erwarteten Größe isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen), mit SacI und NotI (Roche Diagnostics GmbH) nachgeschnitten, anschließend wieder aus dem Agarosegel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) und in ein ebenfalls mit SacI/NotI (Roche Diagnostics GmbH) linearisiertes und isoliertes Vektorfragment von pPIC9K ligiert. Somit war gewährleistet, daß die gesamte Expressionskassette aus pHAP10-3 identisch in pPIC9K vorlag. Das insertierte Fragment wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit den flankierenden Regionen überprüft. Der so entstandene Expressionsvektor wurde pHAP10-3/9K (s. Fig. 3) genannt.

Die Klone mit der höchstens haAP-Expressionsleistung aus der Mehrfachtransformation mit pHAP10-3 (Zeocinresistenz) wurden wie oben beschrieben für die Elektroporation vorbereitet und mit 1 µg mit SacI (Roche Diagnostics GmbH) linearisierten Vektorfragment von pHAP10-3/9K wie oben beschrieben transformiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend 1 bis 3 Tage bei 4°C in 1 M Sorbitol (ICN) aufbewahrt (zur Ausbildung der G418-Resistenz) und dann 100 bis 200 µl auf YPD-Platten (Invitrogen) mit 1, 2 bzw. 4 mg/ml G418 (Roche Diagnostics GmbH) ausplattiert und 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Daraus resultierende Klone wurden wiederum wie beschrieben über den Aktivitätstest auf eine erhöhte Expression der eukaryontischen hochaktiven Alkalischen Phosphatase untersucht.

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Expression von Alkalischer Phosphatase in Hefe

<130> 5387/00/DE

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1476

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 1

```

gaattcctca tcccagctga ggaggaaaac cccgccttct ggaaccgccca ggcagcccag 60
gcccttgatg tagccaagaa gttgcagccg atccagacag ctgccaagaa tgtcatcctc 120
ttcttggggg atgggatggg ggtgcctacg gtgacagcca ctcggatcct aaaggggcag 180
atgaatggca aactgggacc tgagacaccc ctggccatgg accagttccc atacgtggct 240
ctgtccaaga catacaacgt ggacagacag gtgocagaca gcgcaggcac tgccactgcc 300
tacctgtgtg ggggtcaaggg caactacaga accatcgggtg taagtgcagc cgcccgtac 360
aatcagtgca acacgacacg tgggaatgag gtcacgtctg tgatcaaccg ggccaagaaa 420
gcaggggaagg ccgtgggagt ggtgaccacc accaggggtg agcatgcctc ccagccggg 480
gcctacgcgc acacggtgaa ccgaaactgg tactcagacg ccgacctgcc tgctgatgca 540
cagaagaatg gctgccagga catcgccgca cagctggtct acaacatgga tattgacgtg 600
atcctgggtg gaggccgaat gtacatgttt cctgagggga cccagacccc tgaataccca 660
gatgatgcca gtgtgaatgg agtccggaag gacaagcaga acctggtgca ggaatggcag 720
gccaagcacc agggagccca gtatgtgtg aaccgactg cgctccttca ggcggccgat 780
gactccagtg taacacacct catgggcctc tttgagccgg cagacatgaa gtataatgtt 840
cagcaagacc acaccaagga cccgaccctg gcggagatga cggaggcggc cctgcaagtg 900
ctgagcagga acccccgggg cttctacctc ttcgtggagg gaggccgcat tgaccacggt 960
caccatgacg gcaaagctta tatggcactg actgaggcga tcatgtttga caatgccatc 1020
gccaaggcta acgagctcac tagcgaactg gacacgctga tccttgteac tgcagaccac 1080
tcccattgtc tctcttttgg tggctacaca ctgcgtggga cctccatttt cggctctggc 1140
cccggaagg ccttagacag caagtccctac acctccatcc tctatggcaa tggcccaggc 1200
tatgcgcttg gcgggggctc gaggcccgat gttaatggca gcacaagcga ggaaccctca 1260
taccggcagc aggcggccgt gccctggct agcgagacc acgggggcga agacgtggcg 1320
gtgttcgcgc gagggccgca ggcgcacctg gtgcacggcg tgcaggagga gaccttcgtg 1380
gcgcacatca tggcctttgc gggctgcgtg gagccctaca ccgactgcaa tctgccagcc 1440
cccgccaccg ccaccagcat ccccgactag ggtacc 1476

```

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 2

gcgcgaattc ctcattcccag ctgaggagga aaaccccgcc

<210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 3
 cgcgggtacc ctagtcgggg atgctggtgg cggtgg

36

<210> 4
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Bovine

<400> 4

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala
 20 25 30

Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr
 35 40 45

Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly
 50 55 60

Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val
 100 105 110

Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu
 115 120 125

Val Thr Ser Val Ile Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala Val Gly
 130 135 140

Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr
 145 150 155 160

Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala
 165 170 175

Asp Ala Gln Lys Asn Gly Cys Gln Asp Ile Ala Ala Gln Leu Val Tyr
 180 185 190

Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe
 195 200 205

Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Ala Ser Val Asn
 210 215 220

Gly Val Arg Lys Asp Lys Gln Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys
 225 230 235 240
 His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala
 245 250 255
 Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala
 260 265 270
 Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu
 275 280 285
 Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg
 290 295 300
 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His
 305 310 315 320
 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335
 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350
 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380
 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400
 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415
 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430
 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460
 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480
 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485

<210> 5

<211> 1476

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 5

```

gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgctcaa 60
gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaaactg ctgctaagaa tgttattttg 120
tttttgggtg atggtatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggtcaa 180
atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct 240
ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctggtac tgctactgct 300
tacttggtg gtgttaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac 360
aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag 420
gctggtaagg ctgttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggg 480
gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct 540
caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatgtt 600
atthttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca 660
gatgatgctt ctgttaatgg tgtagaaaag gataagcaaa atthtggttca agaattggcaa 720
gctaagcatc aagggtgctc atatgttttg aatagaactg cthttgttgca agctgctgat 780
gattctagtgt ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatgtt 840
caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt 900
ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggg 960
catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt 1020
gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat 1080
agtcattgtt tttcttttgg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tggtttggct 1140
ccaggtaagg cthttggatag taagtcttac acttctatth tgtatggtaa tgggtccagg 1200
tatgctthtg gtggtggttc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct 1260
tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atggtgggtga agatgttgct 1320
gtthtttgta gaggtccaca agctcatttg gttcatgggt ttcaagaaga aactthttgt 1380
gctcatatta tggctthtgc tggttgtgtt gaaccataca ctgattgtaa tttgccagct 1440
ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc 1476

```

<210> 6

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 6

```

gcgcgaattc ttgattccag ctgaagaaga aaatccagct ttttgggaata gacaagctgc 60
tcaagctthg gatgttgc 78

```

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 7

```

ccaaaaacaa aataacattc ttagcagcag tttgaattgg ttgcaacttc ttagcaacat 60
ccaaagcttg 70

```

<210> 8

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 8
gaatgttatt ttgttttttg gtgatggat ggggtgtcca actgttactg ctactagaat 60
tttgaagg 69

<210> 9
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 9
ggaaattgat ccatagccaa tggagtttct ggaccaact taccattcat ttgacccttc 60
aaaattctag 70

<210> 10
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 10
gctatggatc aatttcata cgttgctttg tctaagactt acaatgttga tagacaagtt 60
ccagattctg c 71

<210> 11
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 11
ccaatagttc tgtaattacc cttaacacca cacaagtaag cagtagcagt accagcagaa 60
tctggaactt g 71

<210> 12
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 12
gtaattacag aactattggt gtttctgctg ctgctagata caatcaatgt aataactacta 60
gaggtaatga ag 72

<210> 13
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 13
 agtaacaaca ccaacagcct taccagcctt cttagctcta ttaataacag aagtaacttc 60
 attacctcta gtag 74

<210> 14
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 14
 gctgttggtg ttgttactac tactagagtt caacatgctt ctccagctgg tgcttacgct 60
 catactgtta atag 74

<210> 15
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 15
 caaccattct tttgagcatc agctggcaaa tcagcatcag agtaccaatt tctattaaca 60
 gtatgagc 68

<210> 16
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 16
 gatgctcaaa agaatgggtg tcaagatatt gctgctcaat tgggtttacaa tatgg 55

<210> 17
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 17
 ctttctggaa acatgtacat tctaccacca cccaaaataa catcaatatc catattgtaa 60
 accaattgag ca 72

<210> 18
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 18
 gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca gatgatgctt ctgttaatgg 60
 tgttagaag g 71

<210> 19
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 19
 catattgagc acottgatgc ttagcttgcc attcttgaac caaattttgc ttatcctttc 60
 taacaccatt aac 73

<210> 20
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 20
 gcatcaaggt gctcaatatg tttggaatag aactgctttg ttgcaagctg ctgatgattc 60
 tagtggtact c 71

<210> 21
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 21
 cttcatatca gctggttcaa acaaaccat caaatgagta acactagaat catc 54

<210> 22
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 22
 gaaccagctg atatgaagta taatgttcaa caagatcata ctaaggatcc aactttggc 59

<210> 23
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 23
 cctcttggat ttctagacaa aacttgcaaa gcagcttcag tcatttcagc caaagttgga 60
 tccttag 67

<210> 24
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 24
 gtctagaaat ccaagagggt tttacttggt tgttgaagggt ggtagaattg atcatgggtca 60
 tcatgatgg 69

<210> 25
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 25
 ccttagcaat agcattatca aacataatag cttcagtc aa agccatataa gccttaccat 60
 catgatgacc atg 73

<210> 26
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 26
 gataatgcta ttgctaaggc taatgaattg acttctgaat tggatacttt gattttgggt 60
 actgctgac atag 74

<210> 27
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 27
 ccaaaccaaa aatagaagta cctctcaaag tgtaaccacc aaaagaaaaa acatgactat 60
 gatcagcagt aac 73

<210> 28
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 28
cttctatattt tggtttggct ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctattt 60
tgtatggtaa tgg 73

<210> 29
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 29
ctagtactac cattaacatc tggcttagaa ccaccaccca aagcataacc tggaccatta 60
ccatacaaaa tagaag 76

<210> 30
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 30
gatgttaatg gtagtactag tgaagaacca tcttacagac aacaagctgc tgttccattg 60
gctagtgaag ctcattg 77

<210> 31
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 31
caccatgaac caaatgagct tgtggacctc tagcaaaaac agcaacatct tcaccaccat 60
gagtttcaat agc 73

<210> 32
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 32
gctcatttgg ttcattggtg tcaagaagaa acttttgttg ctcattattat ggcttttggc 60
ggttggttg aacc 74

<210> 33
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 33
 gcgcggtacc ttaatctgga atactagtag cagtagctgg agctggcaaa ttacaatcag 60
 tgtatggttc aacacaacca gc 82

<210> 34
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 34
 gcgcgcctag gagatctaac atccaaagac g 31

<210> 35
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 35
 cgcgcgctag cggatccgca caaacgaag 29

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 36
 Glu Ala Glu Ala Glu Phe Leu Ile Pro Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 37
 Leu Ile Pro Ala
 1

<210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 38
 Glu Ala Glu Ala Glu Phe
 1 5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer eukaryontischen Alkalischen Phosphatase in Hefezellen umfassend die Schritte: a) Klonierung einer Gensequenz in unterschiedlichen Vektoren, b) Transformation der Hefe, c) Expression und d) Reinigung der Alkalischen Phosphatase, dadurch gekennzeichnet, daß
 - ein erster Vektor ein Resistenzgen gegen einen ersten Selektionsmarker aufweist,
 - Transformanten, die das Resistenzgen und die Gensequenz in das Genom integriert haben, durch Wachstum auf Nährmedium mit einer geringen Konzentration an erstem Selektionsmarker selektioniert werden,
 - die Genkopienzahl durch Mehrfachtransformation erhöht wird, wobei Mehrfachtransformanten durch Wachstum auf Nährmedium mit erhöhtem Selektionsdruck selektioniert werden,
 - ein zweiter Vektor, welcher ein Resistenzgen gegen einen zweiten Selektionsmarker aufweist, zugegeben wird,
 - die Genkopienzahl durch Mehrfachtransformation mit dem zweiten Vektor erhöht wird, wobei Mehrfachtransformanten durch Wachstum auf Nährmedium mit erhöhtem Selektionsdruck selektioniert werden, und
 - solche Klone selektioniert werden, die mehrere Kopien der Gensequenz und der Selektionsmarker-Resistenzgene stabil in das Genom integriert haben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Gensequenz SEQ ID NO: 1 entspricht.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 2, wobei die Gensequenz SEQ ID NO: 5 entspricht.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei methylotrophe Hefezellen verwendet werden.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei als Hefestamm *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha* verwendet wird.
6. DNA gemäß SEQ ID NO: 5.
7. Vektor enthaltend SEQ ID NO: 5.

8. Vektor gemäß Anspruch 7, der im wesentlichen dem pHAP10-3 entspricht.
9. Vektor enthaltend die gesamte Expressionskassette aus pHAP10-3 umfassend.
10. Vektor gemäß Anspruch 9, der im wesentlichen pHAP10-3/9K entspricht.
11. Wirtsstamm transformiert mit einem Vektor gemäß Anspruch 9 oder 10.
12. Wirtsstamm transformiert mit dem Vektor pHAP10-3/9K und/oder einem Vektor gemäß der Ansprüche 7 oder 8.
13. Wirtsstamm gemäß Anspruch 12, wobei als Wirtsstamm *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha* verwendet wird.
14. *Pichia pastori* X-33-Stamm transformiert mit einem Vektor gemäß der Ansprüche 8 bis 10.
15. Verfahren zur Herstellung einer eukaryontischen, hochaktiven Alkalischen Phosphatase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym in einem Wirtsstamm gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14 exprimiert wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung bzw. Expression von eukaryontischer Alkalischer Phosphatase in Hefezellen, wobei insbesondere eine DNA, kodierend für eine eukaryontische hochaktive Alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg eingesetzt wird. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Insertion entsprechender Nukleinsäuresequenzen in einen Vektor zur Expression in methylotrophen Hefe-Stämmen sowie entsprechende Vektoren und Wirtsstämme.

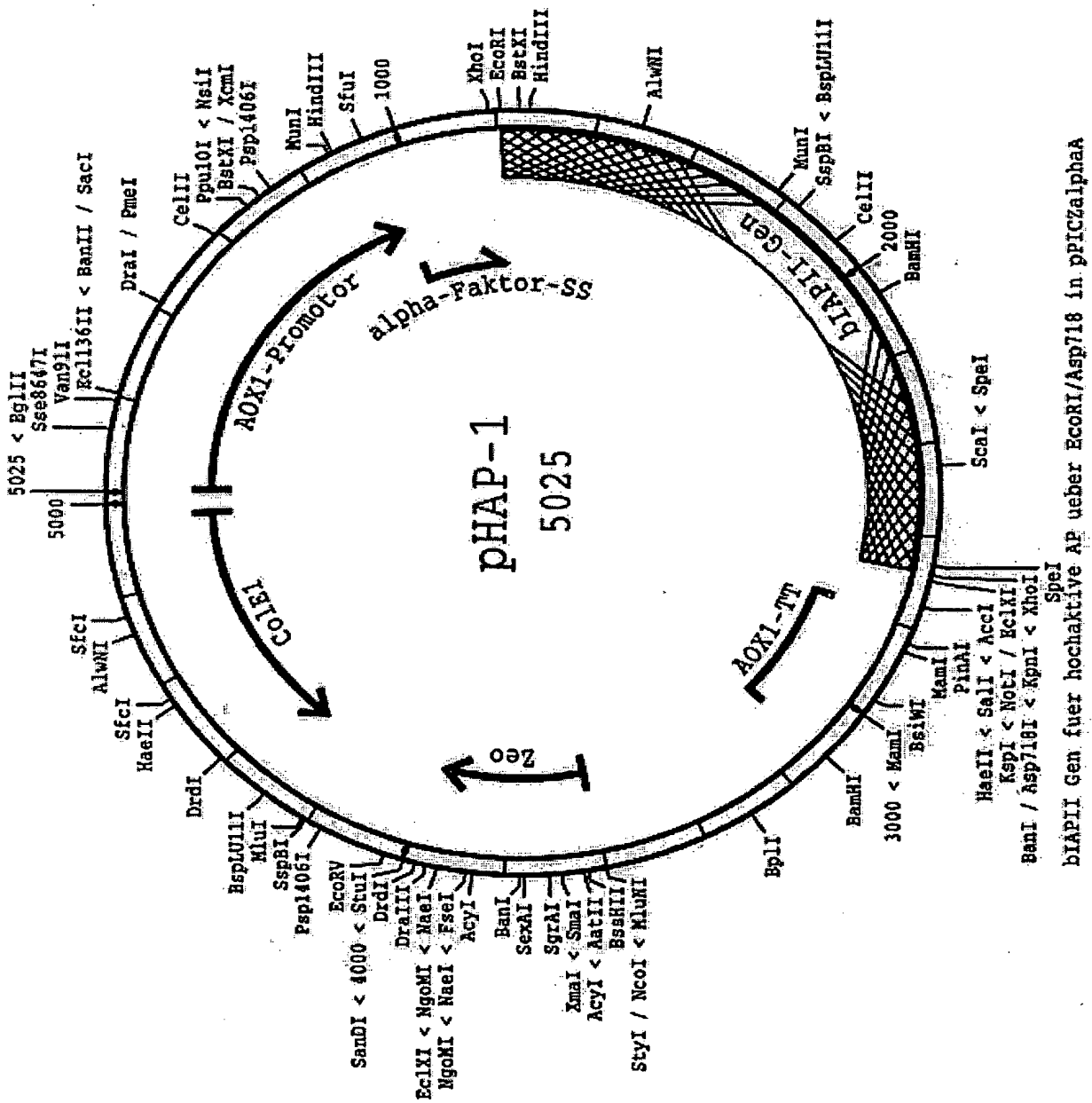
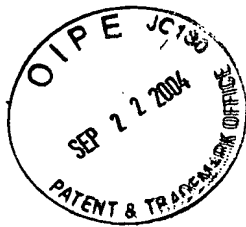
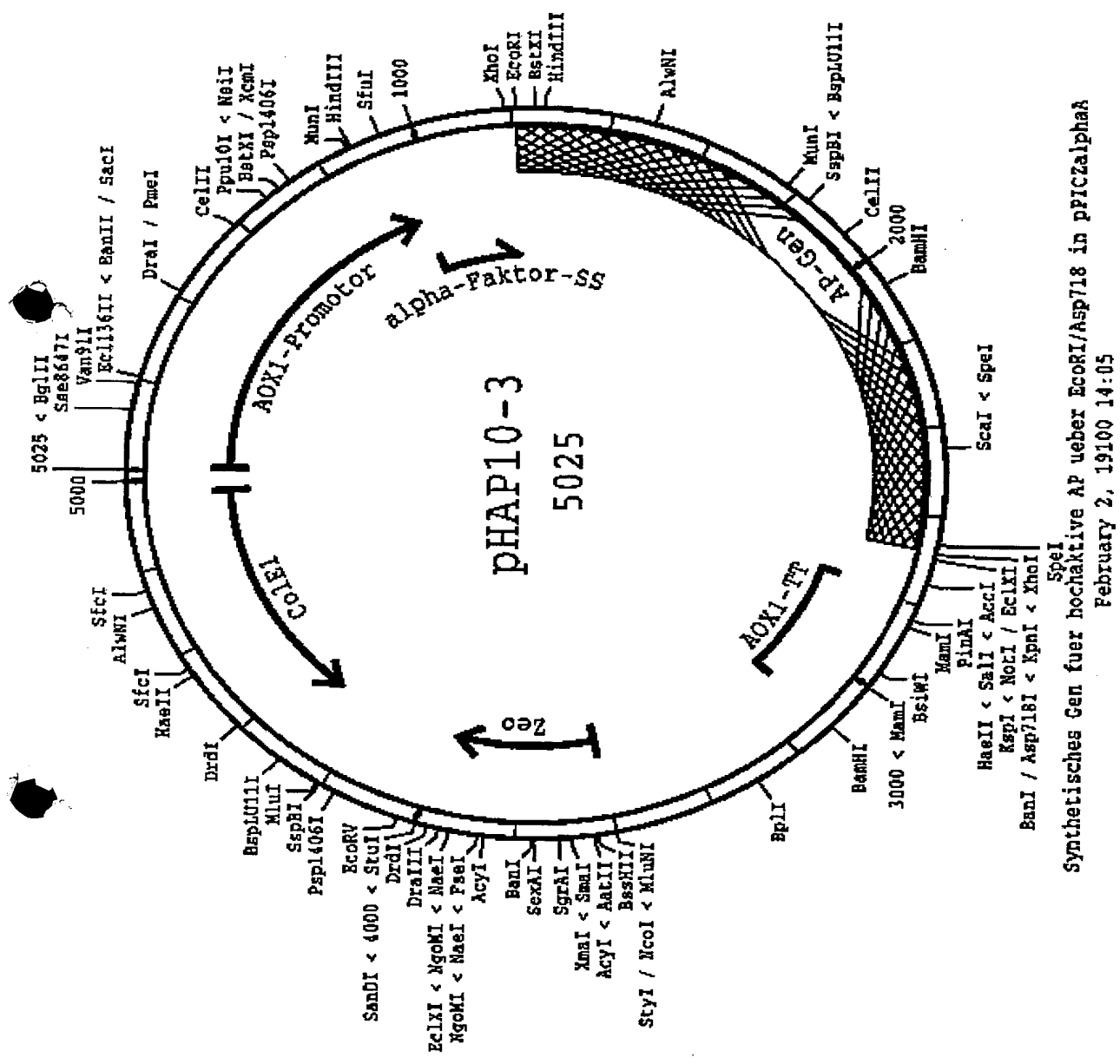


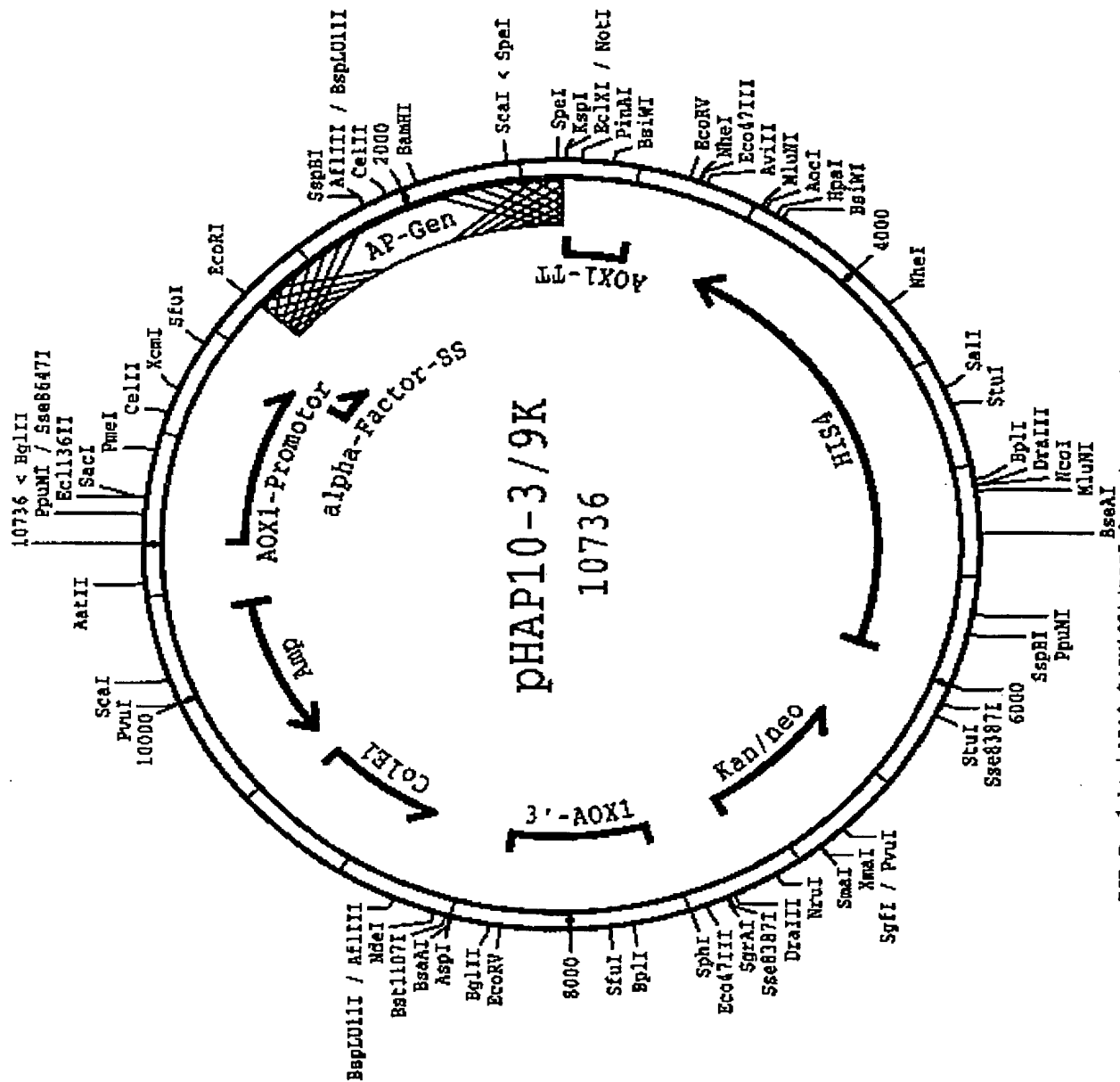
Fig.1



Synthetisches Gen fuer hochaktive AP ueber EcoRI/Asp718 in pRICalpha

February 2, 19100 14:05

Fig. 2



PCR-Produkt hAP10-3(JM105)/PIC5a3a ueber SacI/NotI in pPIC9K
 Mismatch: 0 MinCuts = 1 MaxCuts: 2
 With 198 enzymes: *

Fig. 3